

Rec'd PCT/PTO 14 MAR 2005
T/ES 03 / 004 22



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



REC'D 01 OCT 2003	
WIPO	PCT

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200202094, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 12 de Septiembre de 2002.

Madrid, 17 de septiembre de 2003

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

Del Mar Biarge Martínez

M^a DEL MAR BIARGE MARTÍNEZ

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD

P200202094

02 SEP 12 12:57

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: **ZARAGOZA** CÓDIGO **50**

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL
**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA Y EN SU NOMBRE
Y REPRESENTACIÓN D. GERARDO SANZ SÁIZ,
DIRECTOR DE O.T.R.I.**

NOMBRE

NACIONALIDAD
ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS
ES

DNI/CIF
Q-5018001-G

CNAE
803

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO **C/ BALTASAR GRACIÁN 1, ENTLO.**

LOCALIDAD **ZARAGOZA**

PROVINCIA **ZARAGOZA**

PAÍS RESIDENCIA **ESPAÑA**

NACIONALIDAD **ESPAÑOLA**

TÉLEFONO **976 56 50 03**

FAX **976 35 08 14**

CORREO ELECTRÓNICO **otri@posta.unizar.es**

CÓDIGO POSTAL **50005**

CÓDIGO PAÍS **ES**

CÓDIGO PAÍS **ES**

(7) INVENTOR (ES): APELLIDOS

1. **SARASA BARRIO**
2. **SORRIBAS ALEJALDRE**

NOMBRE

**MANUEL
VICTOR**

NACIONALIDAD

**ESPAÑOLA
ESPAÑOLA**

CÓDIGO

PAÍS
**ES
ES**

(8) ☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

ANTICUERPOS POLICLONALES, MÉTODO DE PREPARACIÓN Y USO DE LOS MISMOS.

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☐ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO

PAÍS
ES

NÚMERO

FECHA

ESPAÑA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: **10**

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: **26**

☐ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS:

☒ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: **3**

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☐ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☐ OTROS: **DISKETTE**



FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

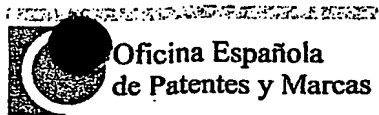
ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Informacion@oeprn.es

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P20 020 200 4

FECHA DE PRESENTACIÓN

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

ANTICUERPOS POLICLONALES, MÉTODO DE PREPARACIÓN Y USO DE LOS MISMOS

Anticuerpos policlonales que reconocen específicamente y con gran afinidad a los péptidos amiloides más importantes, el A β 40 y el A β 42, así como su método de preparación mediante la inmunización de conejos con péptidos de SEC ID N° 1, 2, 3 ó 4.

Empleo de estos anticuerpos en la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides característicos de la enfermedad de Alzheimer como de fármacos inhibidores de su formación.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA

Oficina Española
de Patentes y Marcas

(12)

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

(21) NÚMERO DE SOLICITUD

P 20 020 209 4

(31) NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

(32) FECHA

(33) PAÍS

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN

(62) PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

(71) SOLICITANTE (S)

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DOMICILIO BALTASAR GRACIÁN, 1 ZARAGOZA 5005

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

(72) INVENTOR (ES) MANUEL SARASA BARRIO, VICTOR SORRIBAS ALEJALDRE

(51) Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(54) TÍTULO DE LA INVENCION

ANTICUERPOS POLICLONALES, MÉTODO DE PREPARACIÓN Y USO DE
LOS MISMOS

(57) RESUMEN

ANTICUERPOS POLICLONALES, MÉTODO DE PREPARACIÓN Y USO DE LOS MISMOS

Anticuerpos policlonales que reconocen específicamente y con gran afinidad a los péptidos amiloides más importantes, el A β 40 y el A β 42, así como su método de preparación mediante la inmunización de conejos con péptidos de SEC ID N° 1, 2, 3 ó 4.

Empleo de estos anticuerpos en la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides característicos de la enfermedad de Alzheimer como de fármacos inhibidores de su formación.

Anticuerpos policlonales, método de preparación y uso de los mismos.

La presente invención se refiere a anticuerpos
5 policlonales que reconocen específicamente y con gran afinidad a los dos péptidos amiloides más importantes, el A β 40 y el A β 42, así como a su empleo en la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides característicos
10 de la enfermedad de Alzheimer como de fármacos inhibidores de su formación. Del mismo modo, pueden ser útiles para la valoración de la actividad de las enzimas implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de
15 las enzimas implicadas en la degradación de los mismos, así como de la valoración del nivel de expresión de los genes implicados en toda la maquinaria de eventos que conducen al depósito y formación de placas amiloides, lesiones características de los cerebros de pacientes
20 que sufren la enfermedad de Alzheimer.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Se conocen determinados factores acerca de los
25 fenómenos bioquímicos y metabólicos asociados a la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Dos cambios morfológicos e histopatológicos observados en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer son marañas neurofibrilares (MNF) y depósitos
30 amiloides.

Las marañas neurofibrilares intraneuronales están también presentes en otras enfermedades degenerativas, pero la presencia de depósitos de amiloide tanto en los
35 espacios interneuronales (placas neuríticas) como

en la microvasculatura circundante (placas vasculares) parece ser característica del Alzheimer. De éstas, las placas neuríticas parecen ser las más características (Price, D.L. y col. , Drug Development Research (1985) 5:59-68).

El componente principal de estas placas amiloides es un péptido de 40-42 aminoácidos denominado péptido amiloide A β 4.

10

El péptido amiloide A β 4 es un polipéptido originado por proteólisis a partir de unas glucoproteínas de membrana denominadas proteínas precursoras del péptido amiloide A β 4 (β APP). Estando estas proteínas precursoras del

15

péptido amiloide constituidas por 695 a 770 aminoácidos, siendo todas ellas producidas por el mismo gen.

20

Se han identificado dos variantes principales del péptido amiloide A β 4, el péptido A β 40 y el A β 42, de 40 y 42 aminoácidos respectivamente, que presentan una distribución tisular diferente en condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

25

Nosotros hemos clonado y secuenciado el gen de la β APP en el pollo y hemos demostrado que es prácticamente idéntico al gen humano, pues produce β APPs con una enorme homología, del orden del 95%, a las de la especie humana, y el péptido A β 4, característico de la

30

enfermedad de Alzheimer, es idéntico al humano. Además, el embrión de pollo procesa a las β APPs de tal forma que se produce péptido A β 4, debido a la acción de unas enzimas proteolíticas que provocan la proteólisis de las β APPs en un sitio clave para producir A β 4, la

35

enzima proteolítica que corta las β APPs para producir

A β 4 es denominada β -secretasa.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

- 5 La presente invención proporciona anticuerpos policlonales, capaces de reconocer específicamente mediante cualquier técnica inmunológica convencional (western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, ELISA, RIA, ...) de la presencia de los péptidos
- 10 amiloides A β 40 y A β 42, obtenidos por inmunización de mamíferos, preferiblemente conejos, con una proteína conjugada con un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por
- 15 eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína.
- 20 En una realización particular, el péptido corresponde a SEQ ID NO 1, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 2, opcionalmente alargado por
- 25 adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 3, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En
- 30 otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 4, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. Aunque la eliminación de los restos aminoacídicos terminales no elimina la actividad
- 35 específica, los péptidos preferidos son los de SEQ ID

NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

La provisión de cualquiera de los péptidos,
substantialmente puros, antes mencionados es también
5 parte de la presente invención.

Esta invención también proporciona un método para la
obtención de los anticuerpos policlonales antes
mencionados por inmunización de mamíferos,
10 preferiblemente conejos, con una proteína conjugada a
un péptido seleccionado a partir de un grupo que
consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ
ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los
restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-
15 terminal, y opcionalmente alargados por adición de los
restos de aminoácido apropiados para conjugar la
proteína.

Según una forma de realización preferida de realización
20 de la presente invención, la proteína utilizada para su
conjugación con el péptido es la hemocianina de lapa
(KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

En una realización aún más preferida de la presente
25 invención, los mamíferos utilizados, para su
inmunización con la proteína conjugada al péptido, son
conejos.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se
30 proporciona un nuevo método para la valoración tanto de
fármacos activadores de la degradación de los péptidos
amiloides característicos de la enfermedad de
Alzheimer, como de fármacos inhibidores de su
producción, mediante el uso de los anticuerpos
35 policlonales descritos anteriormente.

Del mismo modo, el método sirve también para valorar la actividad de las enzimas (proteasas) implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de los mismos.

Esta invención también proporciona un método para la detección de la presencia o ausencia de los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 en una muestra, empleando el embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

Según una realización preferida de la presente invención, se proporciona un nuevo método para la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides característicos de la enfermedad de Alzheimer, como de fármacos inhibidores de su producción, mediante el uso del embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un nuevo método para valorar la actividad de las enzimas (proteasas) implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de los mismos, mediante el uso del embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

El método consiste en la inoculación del fármaco en el huevo embrionado del pollo, ya por simple goteo sobre

el propio embrión o alguna de sus membranas, ya por inyección en el vitelo (si el embrión es joven) o saco vitelino (si el embrión es más mayor), en el saco amniótico, en el saco alantoideo (en embriones de más de 6 días de incubación) o en el interior del propio embrión y, tras el tiempo adecuado de incubación, se extrae el embrión y/o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios y se analiza la cantidad de péptidos amiloides, característicos de la enfermedad de Alzheimer, mediante las técnicas convencionales de laboratorio para la cuantificación de péptidos y proteínas como western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación , ELISA, RIA, HPLC, etc.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1.

Acoplamiento de los péptidos a hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin)

Los péptidos fueron acoplados a la proteína hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin), vía n-terminus, utilizando el agente acoplante glutaraldehído. Para lo cual se activó la proteína KLH en solución de buffer borato pH 10. A continuación se añadió el péptido sintético y lentamente se añadió la solución de glutaraldehído 0.3% mientras se agitaba a temperatura ambiente. Tras la adicción de glicina 1M para bloquear el glutaraldehído no reaccionante, se dializó el conjugado péptido-proteína frente a 3 litros de buffer borato pH 8.5 a temperatura de 4 °C. El

conjugado péptido-KLH se almacenó a 4 °C.

Ejemplo 2.

Generación de los anticuerpos policlonales.

- 5 Los cuatro anticuerpos policlonales fueron generados por inmunización de conejos New Zealand White contra los cuatro péptidos acoplados a KLH que se utilizaron como inmunógeno.
- 10 Cada inmunógeno se inyectó en dos conejos, realizándose cinco inyecciones: la primera inyección intradérmica del conjugado péptido-KLH en PBS y emulsionados en adyuvante completo de Freund y cuatro más
- 15 intramusculares, a modo de dosis de recuerdo en los días 14, 28, 49 y 80, del mismo conjugado péptido-KLH en PBS pero esta vez emulsionados en adyuvante incompleto de Freund, realizándose la sangría de control a los 90 días para detectar la presencia de los anticuerpos.

20

Ejemplo 3.

Purificación de los anticuerpos por afinidad.

- 25 Tras la recogida de sangre, se separó el suero y se prepurificó mediante desalado y posteriormente se purificaron los anticuerpos por afinidad en una matriz compuesta por 1,5 ml de material EMD-Epoxy activated (Merck) a la que se añadió 5mg del correspondiente péptido. Las fracciones purificadas se estabilizaron en
- 30 0.1% de BSA (Sigma) y se conservaron a 4 °C, pudiéndose añadir glicerol 20-50% como crioprotector.

Ejemplo 4.

Titulación del anticuerpo por ELISA.

35

- Tras la purificación por afinidad se determinó el título del anticuerpo por ELISA. Para ello se puso el antígeno en una placa ELISA Maxi Sorb de Nunc a razón de 50ng/50µl en PBS pH 7, y se detectó el anticuerpo con anti-IgG de burro conjugada con fosfatasa alcalina, utilizando como sustrato p-nitrofenil fosfato (PNPP) en dietanolamina con 5mM MgCl₂, pH 9.6 y revelado a las 2 horas.
- 5
- 10 En conclusión, los anticuerpos se generaron empleando los diferentes péptidos sintéticos descritos anteriormente acoplados a KLH. Estos péptidos sintéticos contienen un número muy pequeño de aminoácidos, lo cual les hace muy adecuados para la
- 15 producción en cadena de anticuerpos homogéneos, con epítomos predefinidos.

Lista de secuencias.

- 20 SEQ ID NO 1 LVFFAEDV
 SEQ ID NO 2 GLMVGGVV
 SEQ ID NO 3 GLMVGGVVIA
 SEQ ID NO 4 RHDSGYEVHHQK

- 25 En esta solicitud los aminoácidos se abrevian utilizando los códigos de una letra aceptados en el campo, en la forma que se muestra a continuación:

- A= Ala= alanina,
 30 C= Cys= cisteína,
 D= Asp= ácido aspártico,
 E= Glu= ácido glutámico,
 F= Phe= fenilalanina,
 G= Gly= glicina,
 35 H= His= histidina,

I= Ile= isoleucina,
 K= Lys= lisina,
 L= Leu= leucina,
 M= Met= metionina,
 5 N= Asn= asparagina,
 P= Pro= prolina
 Q= Gln= glutamina,
 R= Arg= arginina,
 S= Ser= serina,
 10 T= Thr= treonina,
 V= Val= valina,
 W= Trp= triptofano,
 Y= Tyr= tirosina,

15 La información relativa a la identificación de las
 secuencias peptídicas, descritas en la presente
 invención, que se acompaña a la presente memoria en
 formato legible por ordenador, es idéntica al listado
 de secuencias que se presenta acompañando a la memoria.

20

NUMERO DE SECUENCIAS: 4

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 1:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

25

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

30

SEQ ID NO 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

1

5

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 2:

35

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

5 DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1

5

1

10 INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 3:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 10

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

15 FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1

5

10

20

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 4:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 12

TIPO: aminoácido

25 TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

30

1

5

10

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo policlonal para el reconocimiento específico de las formas principales de péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42, obtenible por
- 5 inmunización de mamíferos con una proteína conjugada a un péptido seleccionado entre el grupo formado por:
- 10 - el péptido de SEQ ID NO 1, el péptido de SEQ ID NO 2, el péptido de SEQ ID NO 3, el péptido de SEQ ID NO 4;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO
 - 15 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4;
 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
 - 20
2. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1, caracterizado porque la inmunización se realiza con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:
- 25 - el péptido de SEQ ID NO 1;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
 - 30 cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
3. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1,
- 35 caracterizado porque la inmunización se realiza

con un péptido seleccionado entre el grupo
constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 2;
- los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 2;
- y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.

4. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1,
caracterizado porque la inmunización se realiza
con un péptido seleccionado entre el grupo
constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 3;
- los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 3;
- y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.

5. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1,
caracterizado porque la inmunización se realiza
con un péptido seleccionado entre el grupo
constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 4;
- los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 4;
- y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la

conjugación de la proteína.

- 5 6. Anticuerpo policlonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, caracterizado porque la proteína es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).
- 10 7. Anticuerpo policlonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, caracterizado porque los mamíferos son conejos.
- 15 8. Péptido sustancialmente puro caracterizado por tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo definido en la reivindicación 1.
- 20 9. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 2.
- 20 10. Péptido según la reivindicación 9, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 1.
- 25 11. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 3.
12. Péptido según la reivindicación 11, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 2.
- 30 13. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 4.
- 35 14. Péptido según la reivindicación 13, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 3.

15. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 5.
- 5
16. Péptido según la reivindicación 15, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 4.
17. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 16, para la obtención de anticuerpos policlonales mediante conjugación a una proteína e inmunización de mamíferos.
- 10
18. Uso según la reivindicación 17, caracterizado porque la proteína es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).
- 15
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 17 a 18, caracterizado porque los mamíferos son conejos.
- 20
20. Método de obtención anticuerpos policlonales para el reconocimiento específico de las formas principales de péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42, caracterizado porque se inmunizan mamíferos con una proteína conjugada a un péptido seleccionado entre el grupo definido en la reivindicación 1.
- 25
21. Método según la reivindicación 20, caracterizado porque la proteína utilizada es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).
- 30
22. Método según cualquiera de las reivindicaciones
- 35

anteriores 20 a 21, caracterizado porque los mamíferos son conejos.

5 23. Método de detección de la presencia o ausencia de los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 en una muestra, caracterizado porque comprende poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo definido como en la reivindicación 1, y detectar la presencia o ausencia del complejo formado por
10 dichos péptidos amiloides y dicho anticuerpo.

24. Método de valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides, como de fármacos inhibidores de su
15 producción, mediante el uso de los anticuerpos policlonales descritos en la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea el huevo embrionado del pollo como modelo animal de ensayo.

20 25. Uso del huevo embrionado de pollo como modelo animal de ensayo para la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides, como de fármacos inhibidores
25 de su producción, mediante el empleo de anticuerpos policlonales como marcadores de la presencia o ausencia de dichos péptidos amiloides.

30 26. Uso según la reivindicación 25, caracterizado porque los anticuerpos policlonales utilizados son los definidos en la reivindicación 1.

SEQUENCE LISTING

<110> Universidad de Zaragoza
 <120> Anticuerpos policlonales, método de preparación
 5 y uso de los mismos.
 <130>
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.1

10 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Síntesis Química
 <220>

15 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(8)
 <223>
 <400> 1

20 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
 1 5

25 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Síntesis Química
 <220>

30 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(8)
 <223>
 <400> 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 1 5

<210> 3
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Síntesis Química
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(10)
 10 <223>
 <400> 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 1 5 10
 15

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Síntesis Química
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(12)
 <223>
 25 <400> 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10
 30